

膠原病抑制遺伝子に関する病態機能解析ならびに治療展開研究

著者	小野 栄夫
URL	http://hdl.handle.net/10097/39642



膠原病抑制遺伝子に関する病態機能解析
ならびに治療展開研究

16390113

平成 16 年度～平成 18 年度科学研究補助金
(基盤研究 (B)) 研究成果報告書

平成 19 年 4 月

研究代表者 小野 栄夫

東北大学大学院医学系研究科教授

〈はしがき〉

過去に我々は、膠原病疾患モデルマウスにおいて2つの「正常化」突然変異を見いだした。本研究は、この2つの遺伝子変異が、どのように膠原病を抑制しているのかを明らかにし、その病態理解にもとづき免疫・炎症性疾患の新たな治療法を提案し、さらに、動物実験でその有効性を検証することを目的に実施された。以下に、その研究成果を報告する。

・研究組織

研究代表者：小野栄夫（東北大学大学院医学系研究科教授）

研究分担者：石井直人（東北大学大学院医学系研究科助教授）

研究分担者：古川 宏（東北大学大学院医学系研究科助手）

（研究協力者：吉田美奈子、森 士朗、能勢真人）

・ 交付決定額（配分額） （金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合 計
平成16年度	8,500,000	0	8,500,000
平成17年度	3,800,000	0	3,800,000
平成18年度	2,700,000	0	2,700,000
総 計	15,000,000	0	15,000,000

• 研究発表

(1) 論文発表

英文

1. Nakatani K, Fujii H, Hasegawa H, Terada M, Arita N, Ito MR, Ono M, Takahashi S, Saiga K, Yoshimoto S, Iwano M, Shiiki H, Saito Y, and Nose M. Endothelial adhesion molecules in glomerular lesions: association with their severity and diversity in lupus models. *Kidney International* **65**:1290-1300 (2004).
2. Nakamura Y, Igarashi K, Suzuki T, Kanno J, Inoue T, Tazawa C, Saruta M, Ando T, Moriyama N, Furukawa T, Ono M, Moriya T, Ito K, Saito H, Ishibashi T, Takahashi S, Yamada S, and Sasano H. E4F1, a novel estrogen-responsive gene in possible atheroprotection, revealed by microarray analysis. *Am J Pathol.* **165**:2019-31 (2004).
3. Oishi H, Miyazaki T, Mizuki S, Kamogawa J, Lu LM, Tsubaki T, Arita N, Ono M, Yamamoto H and Nose M. Accelerating effect of an MRL gene locus on the severity and onset of arthropathy in DBA/1 mice. *Arthritis Rheum* **52**:959-66 (2005).
4. Miyazaki T, Ono M, Qu WM, Zhang MC, Mori S, Nakatsuru S, Nakamura Y, Sawasaki T, Endo Y, and Nose M. Implication of allelic polymorphism of osteopontin in the development of lupus nephritis in MRL/lpr mice. *Eur J Immunol* **35**:1510-20 (2005).
5. Zhang MC, Misu N, Furukawa H, Watanabe Y, Terada M, Komori H, Miyazaki T,

- Nose M, and Ono M. An epistatic effect of the female-specific loci on the development of autoimmune vasculitis and anti-nuclear autoantibody in murine lupus. *Ann Rheum Dis* **65**:495-500 (2006).
6. Saiga K, Toyoda E, Tokunaka K, Masuda A, Matsumoto S, Mashiba H, Kuramochi H, Nemoto K, Abe F, Kawagishi N, Furukawa H, and Ono M. NK026680, a novel compound suppressive of dendritic cell function, ameliorates mortality in acute lethal graft-versus-host reaction in mice. *Bone Marrow Transplant* **37**:317-23 (2006).
 7. Komori H, Furukawa H, Mori S, Ito MR, Terada M, Zhang MC, Ishii N, Sakuma N, Nose M, and Ono M. A signal adaptor SLAM-Associated Protein regulates spontaneous autoimmunity and Fas-dependent lymphoproliferation in MRL-*Fas*^{lpr} lupus mice. *J Immunol* **176**:395-400 (2006).
 8. Satoh K, Kagaya Y, Nakano M, Ito Y, Ohta J, Tada H, Karibe A, Minegishi N, Suzuki N, Yamamoto M, Ono M, Watanabe J, Shirato K, Ishii N, Sugamura K, and Shimokawa H. Important Role of Endogenous Erythropoietin System in Recruitment of Endothelial Progenitor Cells in Hypoxia-Induced Pulmonary Hypertension in Mice. *Circulation* **113**:1442-50 (2006).
 9. Mori S, Zhang MC, Tanda N, Date F, Nose M, Furukawa H, and Ono M. Genetic characterization of spontaneous ankylosing arthropathy with unique inheritance from Fas-deficient strains of mice. *Ann Rheum Dis* **65**:1273-8 (2006).

10. Shinya K, Ebina M, Yamada S, Ono M, Kasai N, Kawaoka Y. Avian flu: influenza virus receptors in the human airway. *Nature* **440**:435-6 (2006).

11. Kitanaka N, Owada Y, Okuyama R, Sakagami H, Nourani MR, Aiba S, Furukawa H, Watanabe M, Ono M, Ohteki T, Kondo H. Epidermal-type fatty acid binding protein as a negative regulator of IL-12 production in dendritic cells. *Biochem Biophys Res Commun* **345**:459-66 (2006).

12. Zhang MC, Mori S, Date F, Furukawa H, Ono M. A non-MHC locus determines tissue-specificity in the pathogenic process underlying synovial proliferation in a mouse arthropathy model. *Ann Rheum Dis*. 2006 Jul 25; [Epub ahead of print]

13. Yoshida M, Saiga K, Hato T, Iwaki S, Niiya T, Arita N, Komori H, Tsubaki T, Furukawa H, Terada M, Maeyama K, Nemoto K, Nose M, and Ono M. *Cappuccino* mutation in an autoimmune-prone strain of mice suggested a role of platelet function in the progression of immune-complex crescentic glomerulonephritis. *Arthritis Rheum* **54**:2934-43 (2006).

14. Saiga K, Tokunaka K, Ichimura E, Toyoda E, Abe F, Yoshida M, Furukawa H, Nose M, and Ono M. NK026680, a novel suppressant of dendritic cell function, prevents the development of rapidly progressive glomerulonephritis and perinuclear anti-neutrophil cytoplasmic antibody (pANCA) in SCG/Kj mice. *Arthritis Rheum* **54**:3707-3715(2006).

15. Abdelwahab SA, Owada Y, Kitanaka N, Adida A, Sakagami H, Ono M, Watanabe M, Spener F, Kondo H. Enhanced expression of adipocyte-type fatty acid binding protein in murine lymphocytes in response to dexamethasone treatment. *Mol Cell Biochem* **299**:99-107(2007)

16. Takahashi M, Kido K, Aoi A, Furukawa H, Ono M, Kodama T. Spinal gene transfer using ultrasound and microbubbles. *J Control Release*. 2006 Nov 6; [Epub ahead of print]

17. Naoko Misu, Mingcai Zhang, Shiro Mori, Tatsuhiko Miyazaki, Hiroshi Furukawa, Takeshi Sasaki, Masato Nose, and Masao Ono. Autosomal loci associated with sex-related difference in the development of autoimmune phenotypes in a lupus model. *Eur J Immunol*, in revision.

18. Izumi Kaneko, Takanori Hishinuma, Yuji Owada, Kaori Suzuki, Noriko Kitanaka, Hisatake Kondo, Junichi Goto, Hiroshi Furukawa, and Masao Ono. Prostaglandin F_{2α} regulates cytokine responses and the degranulation of bone marrow-derived mast cell through the receptors for prostaglandin E. *Clin Exp Allergy*, in revision.

邦文

1. 古川 宏, 小野栄夫: SLE モデルマウスにおける SLAM ファミリー受容体遺伝子の多型と発現. 臨床免疫 44:429-433 (2005)

2. 古川 宏, 小野栄夫 自己免疫と SLAM ファミリー受容体. 臨床免疫

45:41-45 (2006)

3. 古川 宏, 小野栄夫 自己免疫疾患における SLAM ファミリー受容体の役割
医学のあゆみ、印刷中.

(2) 口頭発表

平成16年

1. 森士朗、岩崎美津子、寺田美穂、小森浩章、丹田奈緒子、小野栄夫、能勢
真人：早期に関節強直を自然発症するリコンビナントコンジェニックマウ
ス McH-lpr/lpr-RA1 の樹立 第48回日本リウマチ学会総会・学術集会
4月15日—17日 岡山
2. 小野栄夫、古川宏、小森浩章、能勢真人：自己免疫における SLAM-associated
protein の重要性 第34回日本免疫学会総会・学術集会 12月1日—
3日 札幌
3. 古川宏、張明才、小野栄夫：SLE モデルマウスにおける SLAM ファミリー受
容体遺伝子の多型 第34回日本免疫学会総会・学術集会 12月1日
—3日 札幌
4. ZHANG Ming Cai, FURUKAWA Hiroshi, NOSE Masato, ONO Masao : Genetic
Factors associated with spontaneous autoimmune glomerulonephritis in
MRL/lpr mice 第34回日本免疫学会総会・学術集会 12月1日—3

日 札幌

平成17年

1. 勝寫浩紀、三上芳喜、小野栄夫、笹野公伸、清川貴子：異型分葉状頭管腺過形成（異型 LEGH）の増殖能とバイオマーカーの発現に関する検討 第94回日本病理学会総会 4月14日～16日 横浜
2. 宮崎龍彦、小野栄夫、能勢真人：オステオポンチン遺伝子多型による機能的差異の責任多型部位の検索 第94回日本病理学会総会 4月14日～16日 横浜
3. 古川宏、小森浩章、能勢真人、小野栄夫：SLEモデルマウスにおける SAP と SLAM ファミリー受容体の重要性 第94回日本病理学会総会 4月14日～16日 横浜
4. 三須直子、張明才、寺田美穂、宮崎龍彦、能勢真人、小野栄夫：自己免疫性糸球体腎炎と自己抗体の遺伝的関連性；ループスマウスの遺伝解析 第94回日本病理学会総会 4月14日～16日 横浜
5. 北沢博、張明才、古川宏、小野栄夫：即時性アレルギー反応の IgE 凝集後の反応性に関連する遺伝要因について 第94回日本病理学会総会 4月14日～16日 横浜
6. 小野栄夫：膠原病の疾患モデルと脱疾患モデル 第49回日本リウマチ学会

総会・学術集会 4月17日～20日 横浜

7. 古川宏、小野栄夫：SLE モデルマウスにおける SLAM ファミリー受容体遺伝子の多型と発現 第49回日本リウマチ学会総会・学術総会 4月17日～20日 横浜

8. 小森浩章、寺田美穂、岩崎美津子、小野栄夫、森士朗、能勢真人：組換え近交系マウスを用いた poly I : C による膠原病病態促進効果のゲノム解析 第49回日本リウマチ学会総会・学術総会 4月17日～20日 横浜

9. 三須直子、吉田美奈子、古川宏、佐々木毅、能勢真人、小野栄夫：自己免疫性糸球体腎炎と自己抗体の遺伝的関連性；ループスマウスの遺伝解析 第49回日本リウマチ学会総会・学術総会 4月17日～20日 横浜

10. Mitsuhashi T, K Ishida, H Sasano, M Ono : Eosinophilic Globules in Malignant Melanoma: An Unusual Finding The American society of dermatopathology 42th annual meeting 10月20日～23日 Seattle, WA

11. 吉田あゆ美、小野栄夫、張明才、村田和子、菅村和夫、石井直人：炎症性腸疾患感受性遺伝子の同定 第35回日本免疫学会総会・学術集会 12月13日～15日 横浜

12. MORI Shiro, ZHANG Ming-cai, FURUKAWA Hiroshi, ONO Masao : A unique genetic control for the onset of ankylosing disorders in mice by the

two non-MHC susceptibility loci 第 35 回日本免疫学会総会・学術集会
12 月 13 日～15 日 横浜

1 3. KITANAKA Noriko, OHTEKI Toshiaki, OKUYAMA Ryuhei, FURUKAWA Hiroshi,
ONO Masao, OWADA Yuji : Epidermal-type fatty acid binding protein as
a negative regulator of IL-12 production in murine dendritic cells
第 35 回日本免疫学会総会・学術集会 12 月 13 日～15 日 横浜

1 4. KAWASAKI Aya, FURUKAWA Hiroshi, TSUCHIYA Naoyuki, KUSAOI Makio,
FUKAZAWA Toru, MATSUTA Kumio, ONO Masao, HASHIMOTO Hiroshi, TOKUNAGA
Katsushi : Association of Human SH2D1A (SLAM-associated Protein)
Polymorphism with Early-onset Systemic Lupus Erythematosus 第 35 回
日本免疫学会総会・学術集会 12 月 13 日～15 日 横浜

1 5. 古川宏、張明才、吉田美奈子、小野栄夫 : SLE モデルマウスの CD4+メ
モリーT 細胞における SLAM ファミリー受容体遺伝子の発現 第 35 回日本
免疫学会総会・学術集会 12 月 13 日～15 日 横浜

平成 18 年

1. 古川宏、吉田美奈子、小野栄夫 : SLE モデルマウスの CD4+T 細胞における
SLAM ファミリー受容体遺伝子の発現 第 50 回日本リウマチ学会総会・学術
集会 4 月 23 日～26 日 長崎

2. 小野栄夫、古川宏：肺血管性高血圧症類似の病変を呈する疾患モデルマウスに関する研究 第50回日本リウマチ学会総会・学術集会 4月23日～26日 長崎
3. 森士朗、古川宏、小野栄夫：マウス F1 世代に出現する強直性足関節症の病理・遺伝解析 第50回日本リウマチ学会総会・学術集会 4月23日～26日 長崎
4. 川崎綾、古川宏、土屋尚之、草生真規雄、深沢徹、松多邦雄、橋本博史、小野栄夫、徳永勝士：SH2D1A (SLAM-associated Protein) 遺伝子多型と若年発症全身性エリテマトーデスの関連 第50回日本リウマチ学会総会・学術集会 4月23日～26日 長崎
5. 小野栄夫、古川宏、伊達文子：A new rodent model for pulmonary arterial hypertension associated with OX40 ligand overexpression 第95回日本病理学会総会 4月30日～5月2日 東京
6. 吉田美奈子、古川宏、能勢真人、小野栄夫：急速進行性糸球体腎炎における血小板の重要性 第95回日本病理学会総会 4月30日～5月2日 東京
7. 宮崎龍彦、小森浩章、小野栄夫、能勢真人：糸球体腎炎感受性遺伝子座特異的コンジェニックマウスにおける糸球体腎炎発症の解析 第95回日本

病理学会総会 4月30日～5月2日 東京

8. 森士朗、伊達文子、古川宏、小野栄夫：マウス F1 世代に出現する強直性足関節病変の病理・遺伝解析 第95回日本病理学会総会 4月30日～5月2日 東京
9. 伊達文子、古川宏、小野栄夫：蜂巣肺病変における 2 型肺胞上皮細胞とマスト細胞の接着の意義について 第95回日本病理学会総会 4月30日～5月2日 東京
10. 古川宏、張明才、徳中一寛、能勢真人、小野栄夫：Desmoglein4 遺伝子の欠損した貧毛マウスの皮膚では肥満細胞が増加している 第95回日本病理学会総会 4月30日～5月2日 東京
11. 原田孝之、張傑、荒木亜寿香、中野晃伸、周麗、小野栄夫、能勢真人：神経・雄性生殖器系ミュータント AMS マウス：13 病変責任遺伝子の *ams* 変異の同定 第95回日本病理学会総会 4月30日～5月2日 東京
12. 三橋智子、清水道生、笹野公伸、小野栄夫：Gastrointestinal stromal tumors (GISTs) における CD105 の発現に関する検討 第95回日本病理学会総会 4月30日～5月2日 東京
13. SAIGA Kan, TOKUNAGA Kazuhiro, FURUKAWA Hiroshi, ONO Masao : NK026680, a novel compound suppressive of dendritic cell function, ameliorates

mortality in acute lethal graft-versus-host reaction in maice 第

36回日本免疫学会総会・学術集会 12月11日～13日 大阪

14. MISU Naoko, ZHANG Mingcai, MIYAZAKI Tatsuhoko, SASAKI Takeshi, NOSE Masato, ONO Masao : A male-specific autosomal resistant locus implicated in the gender difference in autoimmune severity 第36回日本免疫学会総会・学術集会 12月11日～13日 大阪

15. OISHI Hisashi, TSUBAKI Takahito, ONO Masao, NOSE Masato, TAKAHASHI Satoru : BAC Transgenic Mice Carrying The Tristetraprolin Locus Prevent Vasculitis In Autoimmune MRL/lpr Mice 第36回日本免疫学会総会・学術集会 12月11日～13日 大阪

16. KANEKO Izumi, OWADA Yuji, FURUKAWA Hiroshi, ONO Masao : Autocrine prostaglandin F2 α enhances cytokine production and degranulation of bone marrow-derived mast cell through the receptors for prostaglandin E 第36回日本免疫学会総会・学術集会 12月11日～13日 大阪

17. KITANAKA Noriko, KANEKO Izumi, ONO Masao, OWADA Yuji : Fatty acid binding protein regulates LPS-induced TNF- α production in mast cells 第36回日本免疫学会総会・学術集会 12月11日～13日 大阪

18. 船山ひろみ、小野栄夫、菅原俊二、高田春比古、遠藤康男 : Concanavalin A (ConA)によるマウス肝炎：マクロファージ (M ϕ) と血小板 (PLT) の役

割 第36回日本免疫学会総会・学術集会 12月11日～13日 大阪

19. 古川宏、小野栄夫：ConA 肝炎における SAP 分子の役割 第36回日本免疫学会総会・学術集会 12月11日～13日 大阪

・ 研究成果による工業所有権の出願・取得状況

工業所有権の名称：肺高血圧モデル動物作製法、肺高血圧治療法、および治療薬物

発明者名：菅村 和夫、石井 直人、小野 栄夫、他3名

権利者名：科学技術振興機構

工業所有権の種類：P T C

工業所有権の番号：P038P02

出願年月日：平成18年7月25日

・ 研究成果

1. 研究の背景と目的

最近、ヒトを含めた多くの生物種のゲノム塩基配列が明らかにされ、仮想遺伝子までも含む、ほぼ全遺伝子の情報が利用可能な時代に入った（ポストゲノム時代）。その結果、ポジショナルクローニングなどの遺伝解析において飛躍的な効率化が実現されており、今後、疾病の遺伝要因の解明にも大きな進展が期待される。

私たちは、膠原病疾患モデルマウスの中から正常化マウスを分離し、そこに「正常化」の原因となった突然変異、すなわち膠原病抑制変異の同定を試みてきた。この方法の利点は、変異遺伝子の正常機能が膠原病の発現、特に生命予後に関わる病的カスケードにクリティカルな役割を果たしていると考え得ることにある。実際これまでに、ポストゲノムの遺伝子情報を活用することにより、2種の膠原病抑制変異の同定に成功している（論文準備中、1種は特許申請済み）。さらに、これらの変異マウスの詳細な解析から、膠原病の病態に関わる新たな分子や組織傷害のエフェクター細胞が想定されており、現在、この新しい着想を基に新たな疾患制御法を想起するに至っている。

本研究で扱う2つの膠原病抑制変異は、元来、重篤な膠原病を若年時に発症して、その為に短命となる MRL/lpr と EOD (*lpr* と *Yaa* を持つ) のマウス2系統に独立に生じた自然突然変異である。興味深かった点は、いずれの変異マウスも健やかに延命するようになり、外見のみならず病理組織学的にも「正常化」を示したことである。これまでの解析から、それぞれ、SAP (SLAM-associated protein ; *xlp*) と新規タンパク質 (シナモン ; *cinn*) の欠失変異であることを突

き止めており、前者はヒトの先天性免疫不全病 XLP (X-linked lymphoproliferative disease)、後者はヒトでアルビニズムと血小板機能不全を示す Hermansky-Pudlac 症候群の原因遺伝子であることが分かった。以上を踏まえて、本研究で明らかにする具体的な項目を以下に挙げる。

- i) SAP やシナモンタンパク質が、どのような作用機序で、また、どのようなエフェクター細胞あるいはインデューサー細胞を介することによって膠原病発症に関係しているのかを明らかにする。
- ii) 膠原病に関わる SAP 依存性受容体を明らかにする。その上で、可溶性受容体などによる膠原病抑制治療をマウス疾患モデルで試みて有効性を評価する。
- iii) 血小板機能と膠原病（腎炎、血管炎、関節炎）の関連性を明らかにする。その上で、血小板抑制や血小板を vehicle としたドラッグ・デリバリーを膠原病抑制治療法として試みて有効性を評価する。
- iv) 腫瘍転移や気道過敏症と血小板機能の関係を明らかにする。その上で、iii) に記した治療法を腫瘍転移や気道炎症の抑制に対して試みて有効性を評価する。

膠原病（特に関節リュウマチ）の治療は、これまでに、ステロイド剤、メソトレキセートなどによる非特異的な免疫・炎症抑制が主であったが、最近、抗 TNF 抗体などの生物製剤による治療の有効性が示され、その台頭の兆しを見せている。アレルギー性疾患を含む免疫・炎症性疾患全体に論点を広げれば、リンパ球受容体、炎症性サイトカイン・ケモカイン、炎症性の転写因子をターゲットにした生物製剤や遺伝子による治療法が試されている現状にある。本研究の 3

年間で、我々が独自に発見した「正常化」マウスを活用することにより、膠原病の病態発生に関わる重要な分子や細胞を明らかにし、自己免疫や炎症病態に関する新たな視点を生み出すことを目的とした。さらに、トランスレーショナルリサーチとして新しい治療法開発にも取り組む。

2. 研究結果

(1) 平成16年度

i) 「1-1. 糸球体腎炎と血小板機能」について

急速進行性糸球体腎炎 (RPGN) の若年発症により早期死亡する EOD マウスの中に、毛色の淡色化 (シナモン色) とともに顕著な延命を表現型とする自然突然変異種を見いだした (図1)。本研究では、この突然変異に伴う病態や免疫・炎症細胞機能の変化を明らかにする目的で、変異遺伝子の同定と表現型の詳細を解析した。その結果、病理組織学的には RPGN の顕著な改善が認められた (図2)。また、免疫・炎症細胞機能の変化を解析したところ、血清抗体価、キラーT細胞やNK細胞の細胞傷害活性、マスト細胞活性には有意な変化は認められなかった。一方、変異マウスに出血時間の延長、血小板セロトニン、ATP の低下、血小板凝集能の低下が認められた (図3)。

また、電子顕微鏡観察により、変異マウスの血小板では血小板細胞内デルタ顆粒内の dense body が欠損していることが明らかとなった (図4)。

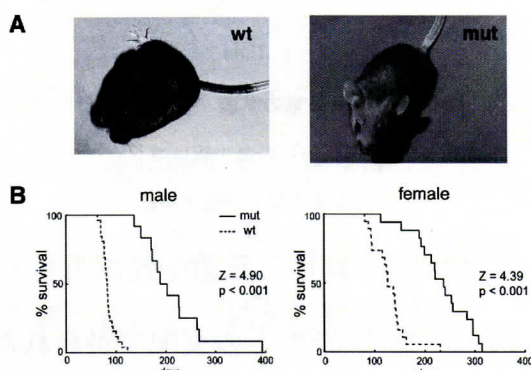


図1. 変異マウスの表現型

A, 変異マウス (*mut*) には毛色の淡色化が見られる。

B, 変異マウスには寿命の延長が認めらる。

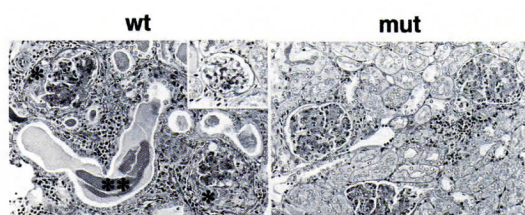


図2. 変異マウスにおける糸球体腎炎の改善

変異マウス (*mut*) では、半月体形成 (*) や尿細管内の硝子円柱形成 (**) が認められない。

次に、変異遺伝子を同定するために、

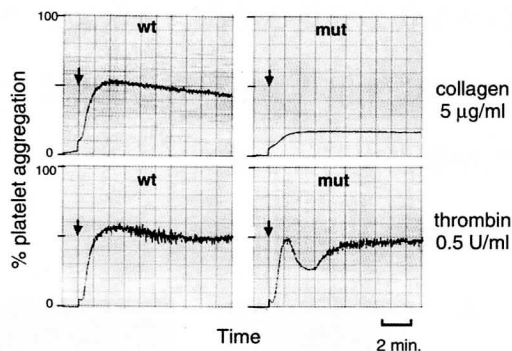


図3. 血小板凝集の試験

変異マウス (*mut*) の血小板はコラーゲンやトロンビンに対する凝集反応の低下が認められる。

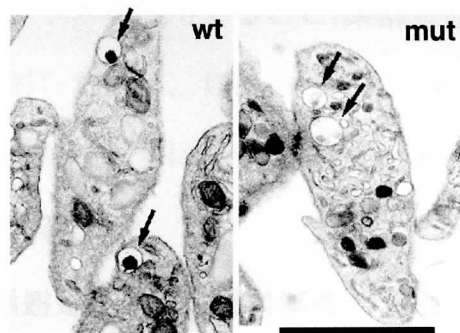


図4. 血小板の電子顕微鏡像

変異マウス (*mut*) の血小板のデルタ顆粒 (矢印) には electron dense body 形成が見られない。

毛色の変化を指標に、マイクロサテライト多型を利用した遺伝連鎖解析を行った。連鎖解析には、日本固有種である野生マウス MSM との交配で得られた仔マウス 358 匹を用いた。その結果、カプチーノ遺伝子 (Cno) の翻訳領域に一塩基の欠失変異を認めた。また、この変異はカプチーノ遺伝子のフレームシフトの原因となっていた。カプチーノ蛋白に対する抗体を用いたウェスタンブロット解析により、変異マウスにはカプチーノ蛋白の発現がないことを示した (図5)。

カプチーノ蛋白は、リソゾーム形成に重要な働きを為すことが知られている。カプチーノ遺伝子変異は、血小板のオルガネラ形成不全を起こすことにより血小板機能を障害し、RPGN 病態の発生を抑制したものと考えられた。RPGN の病態発生には血小板機能が深く関わっていること、また、RPGN の治療には血小板機能の抑制が有効であることが示唆された。

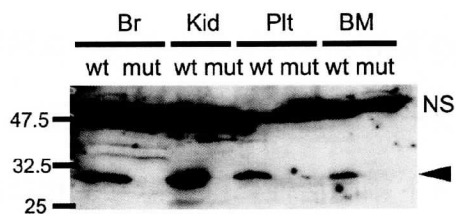


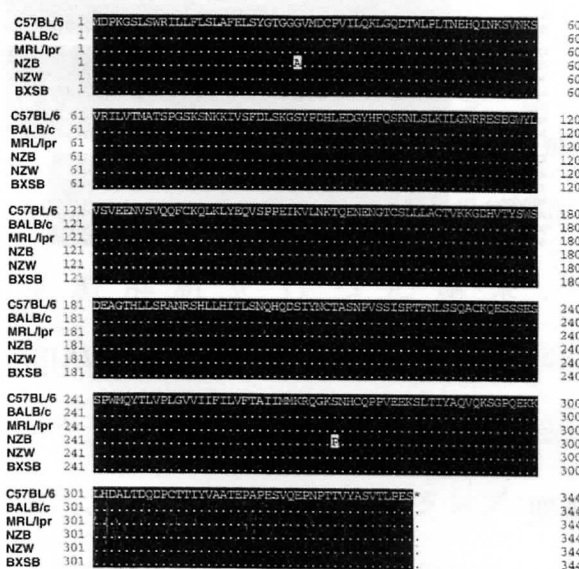
図5. カプチーノ蛋白の組織発現

変異マウス (*mut*) にはカプチーノ蛋白の発現が見られない。Br, whole brain; Kid, kidney; Plt, platelet; BM, bone marrow.

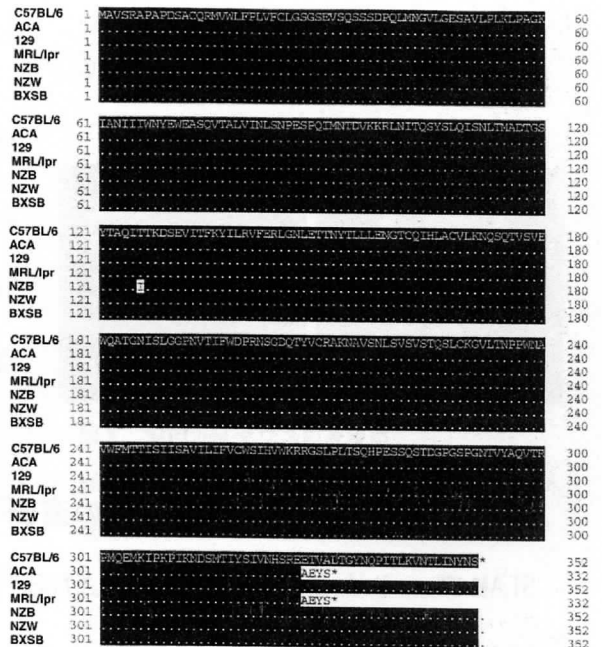
ii) 「2-2. 自己免疫現象に関わるSAPの上流分子」について

SAP は、NK 細胞においては主に 2B4 受容体、T 細胞においては SLAM 受容体などの細胞内領域の特定アミノ酸モチーフ (TxYxxL : immunoreceptor tyrosine-based switching motif, ITSM) に会合する細胞内シグナル伝達分子である。これらの受容体に刺激が入ると、ITSM のチロシン残基のリン酸化に引き続き Fyn キナーゼの活性化が起こる。すなわち、2B4 や SLAM と呼んだ SAP 依存性の受容体からのシグナルは、リンパ球活性化のひとつのモードと理解されている。我々は、SLAM ファミリー受容体のリンパ球活性化モードと自己免疫の関わりを明らかにするために、自己免疫免疫マウスと非自己免疫マウスの間の同受容体遺伝子群の翻訳領域の遺伝子多型を調べた。その結果を図 6 に示す。SLAM ファミリー受容体遺伝子には、およそ 2 パターンの多型が存在し、MRL、NZB、BXSB といった自己免疫系統に共通する多型がハプロタイプを成していることが分かった。

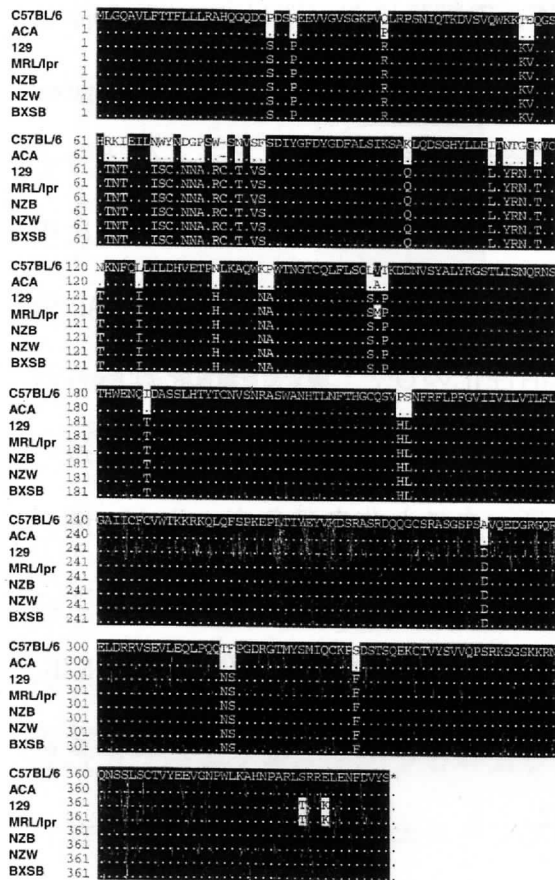
SLAM



Ly108



2B4



Ly9

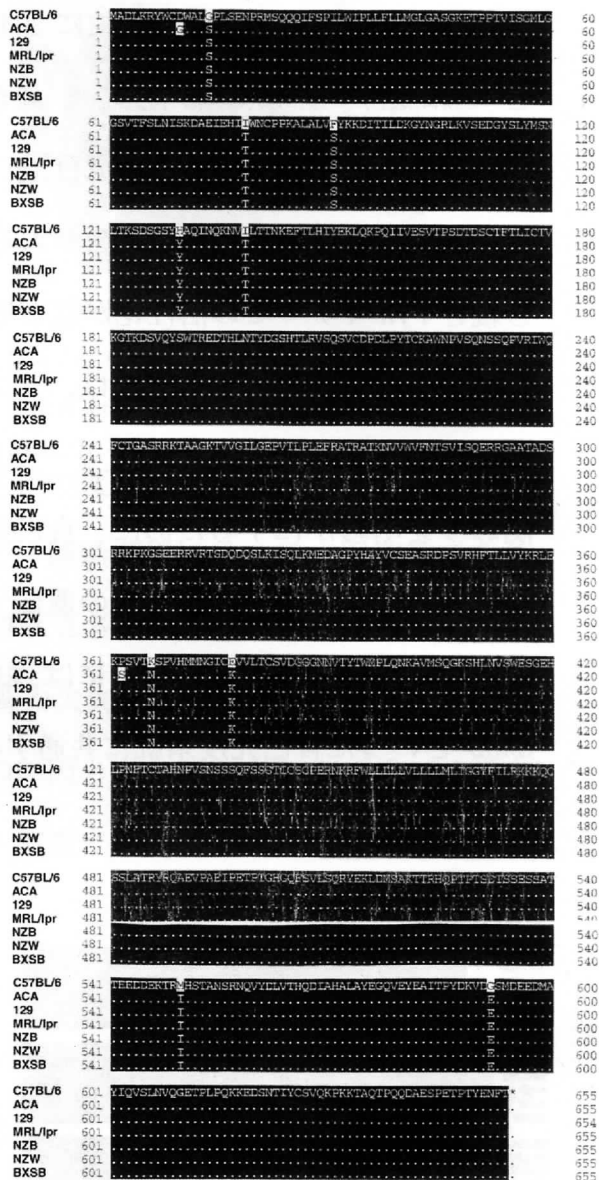


図6. SLAM ファミリー受容体の遺伝子多型

SLAM ファミリー受容体 (SLAM, LY108, 2B4, Ly9) のアミノ酸多型を示す。MRL/lpr, NZB, BXSB は自己免疫マウスとして知られる。

(2) 平成17～18年度(18年度計画は17年度計画の継続)

i) 「1. SAP を介した自己免疫現象の発現機序」について

MRL/Mp. *Fas*^{lpr} マウスは、病理組織学的に、また血清学的に、ヒト SLE 様症候群を呈する自己免疫病モデルであり、進行性の重篤な糸球体腎炎により6か月齢までに半数が死亡する。顕著な表現型として、脾臓ならびに全身リンパ節の腫脹を認める。これは、リンパ球のアポトーシスに関する *Fas* の機能欠損に起因する。我々は MRL/Mp. *Fas*^{lpr} マウスの中に、リンパ節、脾臓の腫脹の消失と寿命延長を示す亜集団を見だし、MRL/rpl と名付けた(図7)。

MRL/rpl に、血清自己抗体価の低下、糸球体腎炎、血管炎など自己免疫病の軽症化が認められた(図8)。リンパ節重量を指標に連鎖解析を行った結果、SAP (SLAM-associated protein) 遺伝子の翻訳エクソンに一塩基挿入変異が同定された。また、SAP の抗血清のウェスタンブロットによって、リンパ球における SAP タンパク質の欠損が確認された(図9)。

SAP は SLAM ファミリー受容体と呼ばれるリンパ球受容体のシグナル伝達分子

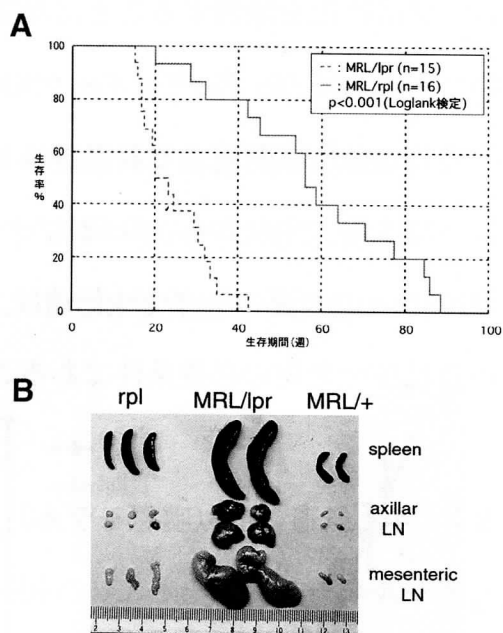


図7. MRL/rpl マウスの表現型

A, 生存曲線。MRL/rpl (*rpl*) マウスで有意な生存期間の延長が見られる。B, MRL/rpl では、脾臓、リンパ節腫脹が軽快している。

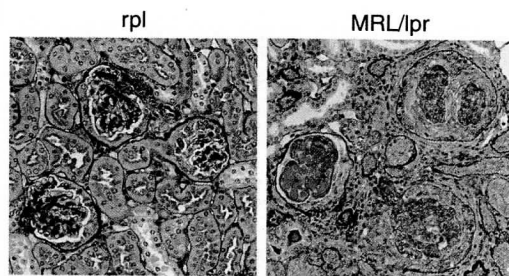


図8. MRL/rpl マウスの表現型

MRL/rpl (*rpl*) では、病理組織上、腎炎の軽快が見られる。

として機能する。その際、Fyn キナーゼの活性化を仲介するアダプター分子として働く。したがって、SAP 欠損は SLAM ファミリー受容体を介したリンパ球活性化を障害することになる。また興味深いことに、MRL/Mp. *Fas^{lpr}* に Fyn 欠損を導入すると、その自己免疫に関連する表現型は MRL/rpl のそれに一致する。すなわち、SLAM ファミリー受容体、SAP、Fyn の一連のシグナル伝達は、MRL/Mp. *Fas^{lpr}*

の自己免疫発症の必要条件であることが本研究によって明らかとなった。

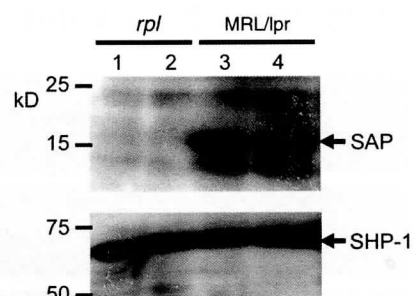


図 9. SAP タンパクの発現

サンプルは胸腺細胞ライゼート。MRL/rpl では SAP タンパクの発現が見られない。

ii) 「4. 気道炎症（喘息モデル）と血小板機能」について

アレルギーモデルとして、当初計画の気道炎症モデルに替えて、IgE 依存性全身性アナフィラキシー (IgE-PSA) モデルにおける血小板機能の役割を解析した。実験では、血小板機能不全を呈する *Cno* 変異マウスを用いた。マウスに TNP 特異的 IgE を静脈注射 (iv) 後、TNP-OVA を iv して引き起こされるショックを体温（直腸温）低下で評価した。その結果、血小板機能不全マウスでは、野生型のコントロールマウスに比べ、顕著に重篤なショック症状を呈した。特に、重症化は IgE-PSA 誘導後 2 時間以降のショック後期相で顕著であった（図 10）。以上より、IgE によって引き起こされるアナフィラキシー反応

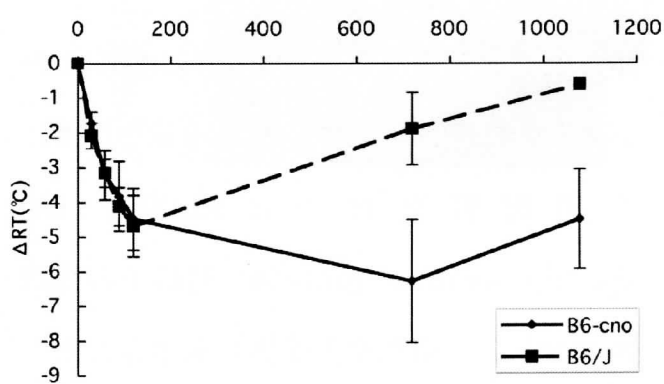


図 10. IgE 依存性全身性アナフィラキシー反応

血小板機能不全マウス (*B6-cno*) では、アナフィラキシー反応の回復が遅れる。

の後期回復過程に、血小板が重要な役割を果たしていると考えられた。今後、マスト細胞と血小板の機能連携の分子メカニズムについて、詳細に検討する予定である。

iii) 「5. 関節炎と血小板」について

関節炎モデルとして、ウシⅡ型コラーゲン誘導関節炎を解析した。実験では、血小板機能不全を呈する DBA/1 背景の Cno ウシⅡ型コラーゲンを完全フロイントアジュバントと不完全フロイントアジュバントで2度免疫し、関節炎を誘導した。その結果、血小板不全マウスでは、野生型のコントロールマウスに比べ、関節炎症状が有意に軽度であった(図11)。以上より、Ⅱ型コラーゲン誘導関節炎においては、血小板が促進的に働いていることが示唆された。今後、血清関節炎などの知見も加え、血小板が関節炎誘導に関わるメカニズムを詳細に検討する予定である。

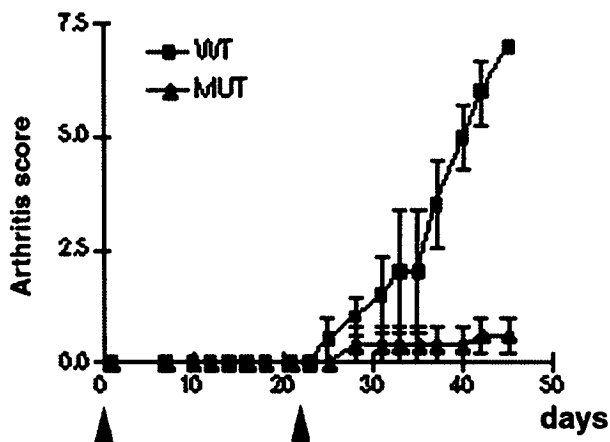


図11. コラーゲン誘導関節炎
血小板機能不全マウス(MUT)では、コラーゲン誘導関節炎の軽症化が見られる。

添付資料

本報告書収録の学術雑誌等発表論文は本ファイルに登録しておりません。なお、このうち東北大学在籍の研究者の論文で、かつ、出版社等から著作権の許諾が得られた論文は、個別に **TOUR** に登録しております。